

University of Groningen

## Analytical techniques and formulation strategies for the therapeutic protein alkaline phosphatase

Eriksson, Hans Jonas Christian

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2004

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Eriksson, H. J. C. (2004). *Analytical techniques and formulation strategies for the therapeutic protein alkaline phosphatase*. [Thesis fully internal (DIV), Groningen]. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Samenvatting

De snelle ontwikkeling van de moleculaire biologie gedurende de afgelopen decennia heeft geleid tot een sterke stijging van het aantal geneesmiddelen van biotechnologische oorsprong. Veel van deze (potentiële) geneesmiddelen zijn eiwitten. Dit zijn stoffen met een complexe structuur, wat op vele terreinen vraagt om een andere aanpak dan voor de traditionele laagmoleculaire geneesmiddelen. Omdat het grote aantal functionele groepen en de complexe structuur bepalend zijn voor de therapeutische activiteit van het eiwit, is het van groot belang om over analytische methoden te beschikken welke de zuiverheid en structuur van het eiwit kunnen vaststellen. Verder is het belangrijk dat voor deze eiwitten formuleringen worden ontwikkeld waarin de conformatie van de eiwitten gehandhaafd blijft en die via geschikte toedieningswegen door de patiënt gebruikt kunnen worden.

In dit proefschrift worden verschillende aspecten van de analyse en formulering van therapeutische eiwitten behandeld aan de hand van het eiwit alkalische fosfatase (AF). AF is een enzym dat in het menselijk lichaam voorkomt in vier isovormen. Het enzym is in staat om endotoxines te defosforyleren waardoor het toxische effect van deze stoffen wordt geëlimineerd. Deze eigenschap maakt AF tot een potentieel geneesmiddel voor de behandeling van sepsis. Het eerste gedeelte van het proefschrift beschrijft de analyse van AF. De nadruk ligt hierbij met name op de bruikbaarheid van capillaire elektroforese (CE) voor de karakterisering van therapeutische eiwitten. CE is een scheidingstechniek die gebaseerd is op verschil in migratiesnelheid van geladen verbindingen die zich in een nauw capillair bevinden waarover een hoogspanning wordt geplaatst. Met CE kunnen in potentie zeer efficiënte scheidingen worden verkregen van stoffen die in lading en/of grootte van elkaar verschillen. Het tweede deel van dit proefschrift behandelt een aantal formuleringsaspecten van therapeutische eiwitten. Vriesdrogen is een veel toegepaste techniek om de eiwitten in vaste vorm te verkrijgen. Om te voorkomen dat het therapeutische eiwit tijdens drogen of de daarop volgende periode van opslag ontleedt, worden aan de te vriesdrogen oplossing vaak suikers toegevoegd. De eiwitten worden nu tijdens het drogen als het ware ingebouwd in een suikermatrix. Deze technologie vormt de kern van dit deel van het onderzoek.

Een overzicht van de mogelijkheden voor de analyse en formulering van therapeutische eiwitten wordt gegeven in **hoofdstuk 1**. De analyse van de zuiverheid van AF na een aantal isoleringsstappen is het onderwerp van **hoofdstuk 2**. De zuiverheid van het eiwit werd met capillaire zone elektroforese (CZE), capillaire gelelectroforese (CGE), matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight massaspectrometrie (MALDI-TOF MS) en een enzymatische methode onderzocht. De initieel gebruikte zuiveringsmethode, bestaande uit isolatie van AF uit humane placenta's gevolgd door ionenwisselingschromatografie, bleek te resulteren in een mengsel dat o.a. nog veel humaan serum albumine bevatte. Verder opzuiveren van het product met behulp van affiniteitchromatografie verhoogde de specifieke activiteit van het materiaal van 6.8 tot 128 U/mg. Het CGE elektroferogram van het opgezuiverde product vertoonde één piek, terwijl de zuiverheid en identiteit verder werd aangegeven door het MALDI-TOF-MS spectrum dat één hoofdpiek vertoonde bij  $m/z$  58 101. CZE analyse van dit product toonde een cluster van AF glycovormen.

De toepassing van CE in het onderzoek naar de ontleding van AF wordt beschreven in **hoofdstuk 3**. AF werd blootgesteld aan verschillende condities zoals hoge en lage zuurgraad, verhoogde temperaturen en het vriesdroogproces. Naast CE werd ook een enzymatische bepaling uitgevoerd. De uitkomsten van de CE en activiteitsbepaling waren niet altijd eenduidig. AF dat was blootgesteld aan verhoogde temperaturen vertoonde een exponentieel verlies in enzymatische activiteit, terwijl de piekgrootte in CE lineair afnam. AF dat was blootgesteld aan sterk zure condities vertoonde een lineaire afname van zowel activiteit als van piekgrootte in CE. Tenslotte bleek dat het vriesdrogen gevolgd door enige tijd opslag resulteerde in pieken die zouden kunnen worden toegeschreven aan AF oligomeren. Op basis van deze resultaten kan worden geconcludeerd dat de combinatie van enzymatische bepaling en CE complementaire informatie levert over de activiteit van het eiwit en de aanwezigheid van ontledingsproducten.

Om therapeutische eiwitten te karakteriseren zou het aantrekkelijk zijn om CE te combineren met MS. Hiermee kan informatie verkregen worden over de identiteit van de gescheiden verbindingen. In **hoofdstuk 4** wordt de combinatie van CE en elektropray ionisatie massaspectrometrie (ESI-MS) voor de analyse van eiwitten onderzocht. Een probleem dat optreedt bij deze combinatie is dat niet alle buffers die gebruikt worden voor CE verenigbaar zijn met MS. Om de mogelijke toepassing van niet-

vluchtige bufferzouten te onderzoeken werd het effect van natriumfosfaat en ammoniumboraat op het MS signaal van de eiwitten insuline, myoglobine en albumine onderzocht in infusie-experimenten. De effecten werden vergeleken met die van de bufferzouten ammoniumformiaat en mierenzuur. De toepassing van mierenzuur als achtergrond elektrolyt resulteerde in de meest intense eiwitsignalen. Natriumfosfaat gaf een vrijwel volledige suppressie van het signaal terwijl ammoniumformiaat en ammoniumboraat een gedeeltelijke suppressie van het signaal veroorzaakten. Na CE-scheiding van eiwitten gebruikmakend van een boraatbuffer konden deze worden gedetecteerd met ESI-MS zonder dat de kwaliteit van de MS spectra afnam. Hierdoor was het mogelijk om de molecuulgewichten van de gescheiden eiwitten te bepalen. De toepasbaarheid van dit CE-MS systeem is gedemonstreerd voor verouderde albuminemonsters waarin de massa's van verschillende ontledingsproducten kon worden bepaald. AF is ook geanalyseerd met CE-MS, maar helaas werden geen MS signalen van het intacte eiwit waargenomen. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de onvolledige ionisatie van dit complexe glycoproteïne.

In **hoofdstuk 5** wordt het effect van verschillende buffers op de glas-rubber transitie temperatuur van de zogenaamde "freeze-concentrated fraction" ( $T_g'$ ) van suiker/buffer oplossingen onderzocht en wordt het effect van buffers op de glas-rubber transitie temperatuur ( $T_g$ ) van de gedroogde poeders beschreven. In het algemeen werd een daling van de  $T_g'$  en de  $T_g$  van de onderzochte systemen gevonden wanneer de hoeveelheid buffer toenam. Deze daling wijst op een homogene verdeling van de buffer in de suikers. Een uitzondering op de bevindingen was de borax buffer. Bij deze buffer namen  $T_g'$  en  $T_g$  toe bij toenemende concentratie bij een pH van 9.8. Bij een pH van 6.0 trad echter een daling op van de  $T_g'$  terwijl de  $T_g$  juist toenam. Dit afwijkende gedrag kan worden verklaard door de vorming van een complex tussen de borax en de suikers in de oplossingen met een pH van 9.8. Ook werden de suikers inuline en trehalose vergeleken. Zowel de  $T_g'$  als de  $T_g$  waren in alle mengsels hoger wanneer inuline als suiker werd verwerkt. Tijdens het invriesproces van de verschillende oplossingen bleek de pH enigszins te dalen. De stabiliteit van AF ingesloten in suikerglazen met buffers pH 9.8 werd ook bepaald. Gedurende het vriesdrogen en de daaropvolgende opslag bij 60 °C gedurende zes dagen trad een afname op in de enzymactiviteit wanneer trehalose werd gecombineerd met grote hoeveelheden ammediol, TRIS of

borax buffer. Ook wanneer inuline werd gecombineerd met borax buffer nam de enzymactiviteit af. In de andere monsters, inuline met alle concentraties van de andere buffers, en trehalose met lage concentraties ammediol of TRIS buffer, werd geen afname van de enzymactiviteit waargenomen. De ontleding kan verklaard worden door de lage  $T_g$  van de trehalose monsters met een hoog buffer gehalte. De slechte resultaten van de borax bevattende monsters worden veroorzaakt door de complexvorming tussen borax en suiker waardoor de suiker niet meer als een adequate stabilisator kan optreden.

In **hoofdstuk 6** wordt de ontwikkeling van een tabletformulering beschreven van AF dat is ingebouwd in verschillende suikers. Het tabletteergedrag van de suikerglazen kon sterk verbeterd worden wanneer de bij 0% relatieve vochtigheid bewaarde monsters werden geconditioneerd bij 45% relatieve vochtigheid. In het bijzonder de neiging tot kappen werd sterk gereduceerd door dit conditioneren. In de tabletten bleek de stabiliteit van AF dat gestabiliseerd was met inuline superieur te zijn aan die van AF gestabiliseerd met trehalose. Het slechte stabiliseren van de trehalose na compactie kan verklaard worden door het feit dat het compactieproces kristallisatie van de geconditioneerde trehalose induceert. Door deze kristallisatie verliest het trehalose zijn stabiliserende werking. Inuline vertoonde geen kristallisatie na compactie, waardoor de stabilisatie van AF gehandhaafd bleef. De goede fysische stabiliteit van de inuline suikerglazen bij hoge vochtigheid en bij druk gecombineerd met de geschikte tableteigenschappen maken deze suiker een geschikte stabilisator voor AF.

De ontwikkeling van een formulering waarmee AF na orale toediening afgeleverd kan worden in de darm wordt beschreven in **hoofdstuk 7**. Hierbij is het van belang dat het zuurgevoelige AF niet in contact komt met de zure maagsappen. Van inuline gestabiliseerde AF werden tabletten geslagen. Deze tabletten werden omhuld met een maagsap resistente omhulling om zodoende het AF te beschermen tegen het maagsap. Tabletten zonder deze omhulling losten snel op in een zure oplossing waarbij de AF activiteit volledig verloren ging door ontleding van het eiwit. Omhulde tabletten bleven gedurende twee uur stabiel in een zure oplossing maar losten snel op wanneer de zuurgraad werd verhoogd tot neutrale waarden zoals die in de darm voorkomen. Na het oplossen van de omhulde tabletten bleek de enzymactiviteit van AF nog volledig intact te zijn. Een *in vivo* studie in ratten toonde aan dat deze tabletten goed in

staat waren om intact AF af te leveren in de darm. De enzymactiviteit van AF in de darm nam toe wanneer er meer tabletten werden toegediend. Deze resultaten tonen aan dat dit product in potentie een bruikbaar geneesmiddel in de behandeling van sepsis zou kunnen zijn.

